

· 论 著 ·

亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达及损伤神经细胞凋亡的影响

吴国祥 李承晏 李涛 李晓清

【摘要】目的 观察亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达及损伤神经细胞凋亡的影响。**方法** 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 大脑中动脉阻塞 2 h, 再灌注损伤 6 h, 用原位缺口末端标记 (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL) 法和免疫组织化学法分别检测假手术组、对照组和亚低温组的凋亡细胞百分率和 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达水平。**结果** 亚低温组 Bcl-2 蛋白表达水平为 $(63.48 \pm 0.47)\%$, 较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而 Bax 和 C-fos 蛋白表达水平和凋亡细胞百分率分别为 $(6.13 \pm 0.93)\%$ 和 $(5.09 \pm 0.21)\%$, 明显低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 亚低温下调大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bax 和 C-fos 蛋白表达水平和上调 Bcl-2 蛋白表达水平, 可能与其抗损伤神经细胞凋亡作用有关。

【关键词】 亚低温; 脑缺血再灌注损伤; Bcl-2; Bax; C-fos; 凋亡

Effects of mild hypothermia on Bcl-2, Bax and C-fos protein expression and cell apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats WU Guoxiang*, LI Chengyan, LI Tao, LI Xiaoqing. * Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To observe the effects of mild hypothermia on Bcl-2, Bax and C-fos protein expression and apoptosis of the injured nervous cell after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** Models of focal cerebral ischemia/reperfusion injury were prepared by 2 hours of occlusion followed by 6 hours of reperfusion of the middle cerebral arteries (MCA) in rats. TUNEL and immunohistochemical technique were used to examine the apoptotic cell rate and the level of Bcl-2, Bax and C-fos protein expression in the sham-operated group, the control group and the mild hypothermia group, respectively. **Results** The level of Bcl-2 protein expression $(63.48 \pm 0.47)\%$ was significantly higher in the mild hypothermia group than that in the control group ($P < 0.05$). The level of Bax and C-fos protein expression $(6.13 \pm 0.93\%, 5.09 \pm 0.21\%)$ and the apoptotic cell rate were significantly lower in the mild hypothermia group than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The decreased level of Bax and C-fos protein expression and the increased level of Bcl-2 protein expression in rats of hypothermia group may be closely related to the decreased rate of cell apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 Mild hypothermia; Cerebral ischemia/reperfusion injury; Bcl-2; Bax; C-fos; Apoptosis

近年来,亚低温的抗损伤神经细胞凋亡作用已成为缺血性脑血管病防治的研究热点之一。本实验观察了亚低温处理大鼠在脑缺血再灌注损伤后, Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率的变化, 并探讨 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达与其抗损伤神经细胞凋亡的关系。

材料与方法

一、动物与分组

健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 170 ~ 230 g。随机分为假手术组 (10 只, 栓线仅插入 8 mm, 使大脑中动脉起始部不致阻塞)、对照组 (10 只, 脑缺血 2 h, 再灌

注损伤 6 h) 和亚低温组 (10 只, 脑缺血 2 h, 再灌注损伤 6 h, 并在脑缺血后立即开始诱导亚低温, 且持续 8 h)。

二、动物模型制作和亚低温处理

采用改良的线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌注损伤模型^[1]。脑缺血后立即将大鼠置于温控环境中以诱导亚低温, 诱导时间约为 30 min, 且使大鼠体温稳定地控制在 $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$, 持续 8 h 后, 立即深度麻醉大鼠, 并断头取脑。

三、标本制作

从额极开始将大鼠大脑沿冠状面平行切成 5 等份, 并分别置于 5 份 10% 中性福尔马林液中固定 24 h 以上, 取中间脑片, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋和切片, 切片厚度 5 μm 。

四、免疫组织化学法检测 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋

基金项目: 湖北省科技厅十五攻关项目资助 (No. 2001AA307B)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院神经内科 (吴国祥、李承晏、李涛), 心内科 (李晓清)

白表达水平

石蜡切片经常规脱蜡水化后,用成套 SABC 法 (Strept-Avidin-Biotin Complex, SABC) 免疫组织化学试剂盒 (博士德公司产品) 检测 Bcl-2、Bax 和 C-fos 蛋白表达水平。具体操作步骤参照 SABC 免疫组织化学试剂盒说明书进行。显微镜下细胞质或核膜上有棕色颗粒者为阳性细胞,每张切片上选择 10 个具有代表性的高倍视野 ($\times 400$), 计算阳性细胞数和阴性细胞数,并计算阳性率 [阳性率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) $\times 100\%$]。

五、用 TUNEL 法检测凋亡细胞

石蜡切片经脱蜡入水后,置于 0.3% 过氧化氢液中,在室温下保持 30 min,再用细胞凋亡检测试剂盒 (武汉博士德公司产品) 检测凋亡细胞。具体操作方法参照细胞凋亡检测试剂盒说明书。在光镜下

($\times 400$) 选择 6 个具有代表性的视野,计数阳性细胞 (镜下核染色呈棕黄色者) 数和阴性细胞数,并计算凋亡细胞百分率 [凋亡细胞百分率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) $\times 100\%$]。

六、统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 χ^2 检验。

结 果

假手术组、对照组及亚低温组 Bcl-2、Bax、C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率比较 (表 1) 可知,对照组的 C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 亚低温组的 Bcl-2 蛋白表达阳性率较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而其 Bax、C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组 Bcl-2、Bax、C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	例数	Bcl-2 蛋白表达阳性率	Bax 蛋白表达阳性率	C-fos 蛋白表达阳性率	凋亡细胞百分率
假手术组	10	0	0	0.15 $\pm$ 0.013	0.5 $\pm$ 0.1
对照组	10	20.72 $\pm$ 0.95	19.62 $\pm$ 0.79	18.82 $\pm$ 0.68*	50 $\pm$ 7*
亚低温组	10	63.48 $\pm$ 0.47 Δ	6.13 $\pm$ 0.93 Δ	5.09 $\pm$ 0.21 Δ	4 $\pm$ 3 Δ

注: * 与假手术组比较, $P < 0.01$; Δ 与对照组比较, $P < 0.05$

讨 论

细胞凋亡是能量依赖的细胞内死亡程序活化而致的“程序性细胞死亡”,是细胞的一种生理性、主动性的“自觉自杀行为”。目前提出的有关凋亡机制的假说主要有营养理论学说、基因学说。许多研究表明,脑缺血再灌注损伤后兴奋性氨基酸、钙超载、自由基及 NO 的增多等因素共同参与了中枢神经系统中 C-fos 的表达过程,诱导损伤神经细胞凋亡的发生^[2,3]。目前, C-fos 表达产物已被认为是脑细胞对缺血反应的敏感指标,所以 C-fos 表达可作为研究脑缺血再灌注损伤后细胞代谢改变的一项新指标,是评价亚低温对脑缺血再灌注损伤干预效果的一种新方法。近年来研究显示,亚低温可降低脑细胞的新陈代谢和氧耗,诱导脑组织的缺血耐受现象,提高缺血脑组织的耐缺血能力,从而减少氧自由基、NO、兴奋性氨基酸的产生和钙超载形成,发挥其抗损伤神经细胞的凋亡作用^[4,5]。本实验结果显示,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率明显高于假手术组 ($P < 0.05$),这与文献报道相符^[3,4];同时这也说明,脑缺血再灌注损伤可诱导 C-fos 蛋白表达增多,进而导致凋亡细胞百分率升高,即加重了缺血性脑损害。本实验结果还显示,亚低温组 C-fos 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率较对照组明显降低,这提示亚低温下调脑

缺血再灌注损伤后 C-fos 蛋白表达,可能是其抗损伤神经细胞凋亡的分子机制之一。

Bcl-2 蛋白产物能抑制细胞凋亡,延长细胞生存周期,即是一种抗细胞凋亡的基因。Bax 是 Bcl-2 基因家族成员,其功能为促进细胞凋亡,即促进细胞凋亡基因。两者在组织细胞中常协同表达,两者比值 (Bcl-2/Bax) 增大时促进细胞存活,反之则导致细胞死亡^[6,7]。还有作者认为, Bax 蛋白受到刺激后,由胞质向线粒体外膜转移,与膜上的电压依赖性离子通道结合,促使其开放而诱导凋亡蛋白从线粒体间隙释放到胞质中,并执行凋亡程序^[8]。Bcl-2 可以与 Bax 结合形成 Bcl-2/Bax 异二聚体,阻止 Bax 插入线粒体外膜^[8,9],保护线粒体电势梯度,调节细胞内 Ca^{2+} 的自稳状态和氧化还原状态等多方面来抑制凋亡。本研究发现,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率均明显升高,而假手术组未见 Bcl-2、Bax 蛋白阳性表达,这与以往文献报道相似^[10,11];亚低温组 Bcl-2 蛋白表达阳性率明显高于对照组,而 Bax 蛋白表达阳性率和凋亡细胞百分率明显低于对照组,也即 Bcl-2/Bax 比值明显高于对照组。由此表明,①脑缺血再灌注损伤可上调 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。有文献提示^[7], Bcl-2 蛋白表达上调为机体抗缺血性脑损害的一种自身保护机制,而后者则促进损伤神经细胞凋亡。②假手术组中也见到极少量的凋亡细胞,这

可能与正常鼠脑细胞的生理性死亡有关系。③亚低温上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 Bax 蛋白表达可能是其抗损伤神经细胞凋亡的另一分子机制。

总之,亚低温抑制大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bax、C-fos 蛋白表达和促进 Bcl-2 蛋白表达,可能与亚低温减少损伤神经细胞凋亡有关。

参 考 文 献

- 1 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, 119: 493-494.
- 2 Takei N, Endo Y. Ca^{2+} ionophore-induced apoptosis on culture embryonic rat cortical neurons. *Brain Res*, 1994, 652: 65-70.
- 3 Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 83-86.
- 4 Maier CM, Sun GH, Kunis D, et al. Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. *J Neurosurg*, 2001, 94:90-96.
- 5 Maier CM, Ahern K, Cheng ML, et al. Optimal depth and duration of

mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke*, 1998, 29:2171-2180.

- 6 Isenmann S, Stoll G, Schroeter M, et al. Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat. *Brain Pathol*, 1998, 8:49-62.
- 7 Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2000, 31:2212-2127.
- 8 Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999, 399:483-487.
- 9 Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, et al. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 406:99-112.
- 10 Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, et al. Expression of Bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1995, 26:1670-1675.
- 11 Chen J, Graham SH, Chan PH, et al. Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport*, 1995, 6:394-398.

(收稿日期:2002-08-01)

(本文编辑:熊芝兰)

· 短篇报道 ·

高压氧治疗心脏术后气栓症昏迷 12 例

黄明 张华 崔勤莉

我院自 1992 年 10 月以来,共施行心脏手术 5 031 例,应用高压氧(2ATA,即 2 个绝对大气压)治疗心脏术后气栓症昏迷 12 例。其中,男 8 例,女 4 例;年龄 2 个月~53 岁;风心病术后 7 例(二尖瓣狭窄瓣膜置换术后 5 例,二尖瓣置换术后瓣周漏修复术后 1 例,二尖瓣+主动脉瓣狭窄瓣膜置换术后 1 例),先心病术后 5 例(法乐氏四联症根治术后 4 例,室缺修补术后 1 例)。上述 12 例病人术前神志清楚,心脏手术均采用体外循环,术后突然出现昏迷。以上诊断符合临床疾病断标准。

高压氧治疗:采用多人舱空气加压,压力 0.2 MPa(2ATA),30 min×2+10 min 方案,即稳压吸氧 60 min,中间休息 10 min,加减压各 25 min,共 120 min。每日 1 次。疗效评定参照脑血管疾病治愈好转标准^[1]。

结果:发病在 24 h 内者大多治愈,超过 72 h 者基本无效。病情危重且并发症多者治疗无效。全部病人中,少者治疗 1 次,多则 10 次。做 1 次治疗者 2 例,做 10 次者 1 例。12 例病人治愈 5 例(占 41.66%),显效 3 例(占 25%),好转 2 例(占 16.67%),无效 2 例(占 16.67%)。总有效率 83.33%。

讨论 空气栓塞的临床表现可因气栓的部位不同而产生相应的症状。动脉发生气泡栓塞时,感觉中枢的突然变化是最常见的症状,从定向力消失到昏迷不等。本组 12 例病人均是心脏术后突然出现昏迷,诊断明确。与其他病因引起的脑栓塞不同的是,气栓致昏迷是心脏手术中发生的一种意外并发症,

属于急症,必须及时处理,否则会危及病人生命。

高压氧是目前治疗气栓症昏迷的有效方法之一,其治疗原理是根据波义耳-马略特定律。当温度不变时,气体的体积与压力成反比。在高压环境中治疗有以下特点:①体内气泡很快缩小,可置换出气体中氮气,加速气栓消除;②气泡-界面炎症作用减轻,消除血流阻塞,促进血管再通;③血氧含量增加,氧分压升高,血氧弥散能力增强,改善栓塞区缺氧状态,促进脑功能恢复;④减轻脑水肿,降低血糖,加速脑代谢恢复正常。

治疗结果提示,发病 24 h 内治疗者大多治愈,说明病程越短,治疗越早,效果越好;反之病程越长,病情越重效果越差;并发病越多则治疗越无效。本组 2 例治疗无效者为手术后并发脏器功能衰竭患者,经采用多种方法治疗无效后才行高压氧治疗,故无效亦在预料之中。

限于本院氧舱条件,12 例昏迷患者治疗压力均采用 0.2 MPa(2ATA),取得较好疗效,总有效率达 83.33%。从另一个侧面说明,治疗的关键在于及时,至于用多高压比较合适,尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 孙传兴,主编.临床疾病诊断依据治愈好转标准.北京:人民军医出版社,1987.373.

(收稿日期:2002-03-03)

(本文编辑:熊芝兰)